

Rec'd PCT/PTO 02 DEC 2004

#2
JP03/06942

日 本 国 特 許 庁

02.06.03

JAPAN PATENT OFFICE

10/516705

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 6月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-162206

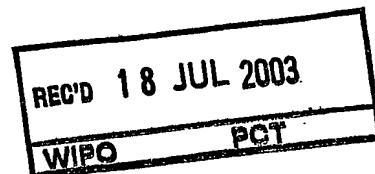
[ST.10/C]:

[JP2002-162206]

出 願 人

Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

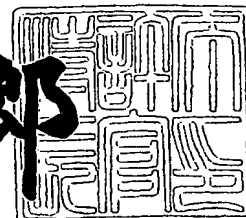


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3052652

【書類名】 特許願
【整理番号】 B02173
【提出日】 平成14年 6月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 31/00

A61K 45/00
C12N 15/01
C12N 5/06
G01N 33/15
G01N 33/566
G01N 33/574

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区木川西1丁目12-4

【氏名】 原 隆人

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区学園東町1丁目4番地 102-30

1

【氏名】 日下 雅美

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区西岡本2-25-4-1010

【氏名】 宮崎 純一

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100114041

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 秀一

【選任した代理人】

【識別番号】 100106323

【弁理士】

【氏名又は名称】 関口 陽

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 0203423

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異アンドロゲン受容体、それを発現する癌細胞、それらの作出方法およびそれらの用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のアミノ酸配列:

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、アミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンに置換されたアミノ酸配列;

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、アミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換され、且つアミノ酸番号882のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列;

と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩。

【請求項2】 請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドであって、正常アンドロゲン受容体のアンドロゲンとの結合に必要な領域に対応する部分アミノ酸配列を少なくとも含有する部分ペプチド、もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項3】 請求項1記載の蛋白質または請求項2記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項4】 DNAである請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 以下の(a)または(b)の塩基配列:

(a) 配列番号1で表わされる塩基配列において、塩基番号2237の塩基がチミンに置換された塩基配列;

(b) 配列番号1で表わされる塩基配列において、塩基番号2237もしくは2238の塩基がチミンに置換され、且つ塩基番号2644の塩基がグアニンに置換された塩基配列;

を有する請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3記載のポリヌクレオチドを含有する診断薬。

【請求項7】 ホルモン非依存性癌の診断用である請求項6記載の診断薬。

【請求項8】 請求項3記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

【請求項 9】 請求項 8 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体

【請求項 10】 請求項 1 記載の蛋白質を産生する能力を有する動物細胞。

【請求項 11】 動物細胞が癌細胞である請求項 10 記載の動物細胞。

【請求項 12】 癌細胞が前立腺癌由来の細胞である請求項 11 記載の動物細胞。

【請求項 13】 請求項 9 記載の形質転換体または請求項 10 記載の動物細胞を培養し、請求項 1 記載の蛋白質または請求項 2 記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質またはその塩、または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

【請求項 14】 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体であって、正常アンドロゲン受容体蛋白質またはその塩を認識しない抗体。

【請求項 15】 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号 746 のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する抗体であって、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号 882 のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を認識しない抗体。

【請求項 16】 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号 882 のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する抗体であって、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号 746 のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を認識しない抗体。

【請求項 17】 請求項 1 記載の蛋白質の転写因子活性を抑制する中和抗体である請求項 14 記載の抗体。

【請求項 18】 請求項 14～16 のいずれかに記載の抗体を含有してなる

診断薬。

【請求項 19】 ホルモン感受性癌のアンドロゲン非依存期移行の診断用である請求項 18 記載の診断薬。

【請求項 20】 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、アンドロゲンと請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 21】 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする、アンドロゲンと請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 22】 請求項 20 記載のスクリーニング方法または請求項 21 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、アンドロゲンと請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩

。 【請求項 23】 請求項 22 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬

。 【請求項 24】 アンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤である請求項 23 記載の医薬。

【請求項 25】 請求項 3 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質をコードする mRNA の定量方法。

【請求項 26】 請求項 14～16 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量方法。

【請求項 27】 請求項 25 または 26 記載の定量方法を用いることを特徴とするホルモン感受性癌のアンドロゲン非依存期移行の診断方法。

【請求項28】 所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性である癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で培養して増殖が認められた癌細胞株を選択し、該癌細胞株におけるアンドロゲン受容体遺伝子の塩基配列を解析して該配列に変異を生じた株を選択することを特徴とする、変異アンドロゲン受容体を発現する該抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株の作出方法。

【請求項29】 変異部位が該抗アンドロゲン剤の投与により出現する臨床的変異部位と一致することを特徴とする請求項28記載の方法。

【請求項30】 変異アンドロゲン受容体を発現し、且つ所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性である癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で培養して増殖が認められた癌細胞株を選択し、該癌細胞株における変異アンドロゲン受容体遺伝子の塩基配列を解析して該配列に他の変異を生じた株を選択することを特徴とする、多重変異アンドロゲン受容体を発現する該抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株の作出方法。

【請求項31】 抗アンドロゲン剤がフルタミドもしくはそのアナログまたはピカルタミドもしくはそのアナログである請求項28～30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】 請求項28記載の方法により得られる変異アンドロゲン受容体を発現する癌細胞株。

【請求項33】 請求項30記載の方法により得られる多重変異アンドロゲン受容体を発現する癌細胞株。

【請求項34】 アンドロゲン応答エレメントの制御下にある発現解析可能な遺伝子をさらに含有する請求項32または33記載の癌細胞株。

【請求項35】 該遺伝子が前立腺特異的抗原遺伝子または外来レポーター遺伝子である請求項34記載の癌細胞株。

【請求項36】 請求項32または33記載の癌細胞株を被験物質の存在下で培養することを特徴とする、該癌細胞株において発現する変異アンドロゲン受容体に対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法。

【請求項37】 請求項34記載の癌細胞株を被験物質の存在下で培養し、該癌細胞におけるアンドロゲン応答エレメントの制御下にある遺伝子の発現を解

析することを特徴とする、該癌細胞株において発現する変異アンドロゲン受容体に対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法。

【請求項38】 請求項36または37記載の方法により選択される変異アンドロゲン受容体に対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤。

【請求項39】 アンドロゲン感受性癌の細胞を被験物質の存在下で培養し、該条件下で増殖し得る癌細胞株の出現の有無を経時的に調べることを特徴とする、抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法。

【請求項40】 請求項39記載の方法により選択される抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤。

【請求項41】 アンドロゲン受容体の変異非誘発性または難誘発性である請求項40記載の抗アンドロゲン剤。

【請求項42】 請求項38または40記載の抗アンドロゲン剤を含有してなる、アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤。

【請求項43】 請求項38または40記載の抗アンドロゲン剤の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、該哺乳動物におけるアンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療方法。

【請求項44】 アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤の製造のための、請求項38または40記載の抗アンドロゲン剤の使用。

【請求項45】 異なる変異アンドロゲン受容体に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤を組み合わせる、アンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤。

【請求項46】 2種以上の抗アンドロゲン剤のうちの1つが請求項36または37記載の方法により選択される、請求項45記載の剤。

【請求項47】 異なる変異アンドロゲン受容体に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤の各有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、該哺乳動物におけるアンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期

のホルモン感受性癌の予防・治療方法。

【請求項48】 2種以上の抗アンドロゲン剤のうちの1つが請求項36または37記載の方法により選択される、請求項47記載の方法。

【請求項49】 アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤の製造のための、異なる変異アンドロゲン受容体に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤の使用。

【請求項50】 2種以上の抗アンドロゲン剤のうちの1つが請求項36または37記載の方法により選択される、請求項49記載の使用。

【請求項51】 請求項28記載の方法により同一の変異アンドロゲン受容体を発現する抵抗性癌細胞株を生じさせ得る抗アンドロゲン剤を1つの群として、他の変異アンドロゲン受容体を発現する抵抗性癌細胞株を生じさせ得る抗アンドロゲン剤からなる群と区分することを特徴とする、抗アンドロゲン剤の分類方法。

【請求項52】 請求項51記載の方法により異なる群に分類される2種以上の抗アンドロゲン剤を組み合わせてなる、アンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤。

【請求項53】 請求項51記載の方法により異なる群に分類される2種以上の抗アンドロゲン剤の各有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、該哺乳動物におけるアンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療方法。

【請求項54】 アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤の製造のための、請求項51記載の方法により異なる群に分類される2種以上の抗アンドロゲン剤の使用。

【請求項55】 請求項51記載の方法によりある群に分類される抗アンドロゲン剤の有効量を長期投与することにより該抗アンドロゲン剤に対する抵抗性癌が出現した哺乳動物に、他の群に分類される抗アンドロゲン剤の有効量を投与することを特徴とする、アンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト前立腺癌細胞由来の変異アンドロゲン受容体、それを発現するヒト前立腺癌細胞株、それらの作出方法、並びにそれらを用いたアンドロゲン非依存期の前立腺癌にも増殖抑制作用を示す抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法などに関する。

【0002】

【従来の技術】

転移を有する進行期前立腺癌に対しては世界的にアンドロゲン抑制内分泌療法を第一選択とするのが標準的である。また、転移を有しない限局性前立腺癌においても、前立腺全摘除術や放射線療法後に抗アンドロゲン剤による内分泌療法を行なうことにより前立腺癌の進行を遅らせることが証明され、限局性前立腺癌にも内分泌療法が広がりつつある。

【0003】

アンドロゲンとは男性ホルモン作用を持つステロイドホルモンの総称であり、精巣で合成されるテストステロンや、副腎皮質で合成されるデヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオンなどが挙げられる。アンドロゲンの約95%は精巣から分泌されるので、アンドロゲン抑制内分泌療法としては、精巣由来のテストステロンを遮断するための外科的（除辜術）または薬物（エストロゲン、LHRHアゴニスト等）去勢が頻用されている。しかしながら、副腎皮質由来のテストステロン前駆体は前立腺細胞内で高活性型のジヒドロテストステロン（DHT）に変換されるため、見かけ上はわずか数%であっても前立腺癌病巣にある割合で存在すると考えられるアンドロゲン高感受性癌細胞に対する増殖刺激として無視できない場合がある。そのため、前立腺でのアンドロゲンのレセプターとの結合を拮抗的に阻害する抗アンドロゲン剤（特に非ステロイド性薬）を去勢術と併用するMAB（Maximal Androgen Blockade）療法も行われている。

【0004】

一方、内分泌療法を施されたほとんどの進行期症例で遅かれ早かれ直面するアンドロゲン非依存性再燃癌に対する効果的な予防・治療法は未だ開発されていない

い。内分泌療法に対する再燃癌の機序は未だ解明されていないが、アンドロゲンレセプター（AR）遺伝子の増幅もしくは過剰発現によりアンドロゲン高感受性を獲得した細胞の出現・増加や、ARの変異によりアンドロゲン以外の物質（例えば、グルココルチコイドや抗アンドロゲン剤そのもの）がアゴニストとして作用するようになる等の、複数の要因が明らかになりつつある。

【0005】

例えば、抗アンドロゲン剤投与後の再燃癌とARの変異との関係についていくつかの臨床的知見が報告されている。即ち、フルタミドと去勢の併用による内分泌療法後に前立腺癌が再燃した患者17例中5例においてARの変異が認められ、その全てが877番目のアミノ酸（配列番号2のアミノ酸配列においてはアミノ酸番号882に相当する）のミスセンス変異であった（Taplin et al., *Cancer Res.*, 59: 2511-2515, 1999）。このタイプの変異ARに対してフルタミドをはじめとするいくつかの抗アンドロゲン剤は、逆に癌細胞の増殖を刺激する作用を示した（Veldscholte et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173: 534-540, 1990）。また、ピカルタミドと外科的去勢の併用による内分泌療法後に前立腺癌が再燃した患者由来の生検サンプル11例中3例においてARのミスセンス変異が確認されたが、その変異部位はいずれもフルタミド抵抗性再燃癌で顕著にみられる877番目のアミノ酸とは異なっていた（Haapala et al., *Lab. Invest.*, 81: 1647-1651, 2001）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

ARの変異に基づくアンドロゲン非依存性癌の予防・治療に有用な薬剤を開発する上で、当該変異ARを発現する癌細胞株は非常に有用な研究ツールである。しかしながら、これまでに報告されている変異AR発現癌細胞はいずれも再燃癌もしくは治療前の前立腺癌から臨床的に得られたものであり、ARを発現する癌細胞にインビトロで変異を誘発して、臨床的に見出されるアンドロゲン非依存性癌由来の変異ARと同様の変異を有するARを発現する癌細胞株を樹立したという例はない。また、アンドロゲン非依存性癌から臨床的に見出される変異ARのほとんどはアミノ酸レベルで単一の変異を有するものであり、2箇所以上のアミ

ノ酸に変異を有するARの報告例は皆無ではないが非常に稀である。

したがって、本発明の目的は、臨床的に見出されるアンドロゲン非依存性癌由来の変異ARと同様の変異を有するARを発現する癌細胞株をインビトロで作出する方法、並びに該方法により得られる変異ARおよびそれを発現する癌細胞株を提供することであり、それらを用いて内分泌療法に対するアンドロゲン非依存性再燃癌の予防・治療に有効な薬剤をスクリーニングする方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、所定の抗アンドロゲン剤に感受性であるヒト前立腺癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で長期間培養すると、抗アンドロゲン剤の効力が著しく低下するかあるいは逆にアゴニスト様作用を示すような変異がARに誘発され、結果的に抗アンドロゲン剤抵抗性、即ちアンドロゲン非依存性癌となって増殖を開始することを見出した。さらに、増殖が認められた癌細胞からARのcDNAを単離してその全塩基配列を解析した結果、ARの変異部位は抗アンドロゲン剤による内分泌療法を施された患者の再燃癌から臨床的に得られる変異ARのそれとよく一致することを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、

[1] 以下の(a)または(b)のアミノ酸配列：

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、アミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンに置換されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、アミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換され、且つアミノ酸番号882のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列；

と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、

[2] 上記[1]記載の蛋白質の部分ペプチドであって、正常アンドロゲン受容

体のアンドロゲンとの結合に必要な領域に対応する部分アミノ酸配列を少なくとも含有する部分ペプチド、もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

[3] 上記[1]記載の蛋白質または上記[2]記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

[4] DNAである上記[3]記載のポリヌクレオチド、

[5] 以下の(a)または(b)の塩基配列：

(a) 配列番号1で表わされる塩基配列において、塩基番号2237の塩基がチミンに置換された塩基配列；

(b) 配列番号1で表わされる塩基配列において、塩基番号2237もしくは2238の塩基がチミンに置換され、且つ塩基番号2644の塩基がグアニンに置換された塩基配列；

を有する上記[3]記載のポリヌクレオチド、

[6] 上記[3]記載のポリヌクレオチドを含有する診断薬、

[7] ホルモン非依存性癌の診断用である上記[6]記載の診断薬、

[8] 上記[3]記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

[9] 上記[8]記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

[10] 上記[1]記載の蛋白質を産生する能力を有する動物細胞、

[11] 動物細胞が癌細胞である上記[10]記載の動物細胞、

[12] 癌細胞が前立腺癌由来の細胞である上記[11]記載の動物細胞、

[13] 上記[9]記載の形質転換体または上記[10]記載の動物細胞を培養し、上記[1]記載の蛋白質または上記[2]記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする上記[1]記載の蛋白質またはその塩、または上記[2]記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

[14] 上記[1]記載の蛋白質もしくはその塩または上記[2]記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体であって、正常アンドロゲン受容体蛋白質またはその塩を認識しない抗体、

[15] 配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号746のト

トリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する抗体であって、配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号882のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を認識しない抗体、

[16] 配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号882のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩に対する抗体であって、配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換されたアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を認識しない抗体、

[17] 上記[1]記載の蛋白質の転写因子活性を抑制する中和抗体である上記[14]記載の抗体、

[18] 上記[14]～[16]のいずれかに記載の抗体を含有してなる診断薬、

[19] ホルモン感受性癌のアンドロゲン非依存期移行の診断用である上記[18]記載の診断薬、

[20] 上記[1]記載の蛋白質もしくはその塩または上記[2]記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、アンドロゲンと上記[1]記載の蛋白質もしくはその塩または上記[2]記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

[21] 上記[1]記載の蛋白質もしくはその塩または上記[2]記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする、アンドロゲンと上記[1]記載の蛋白質もしくはその塩または上記[2]記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

[22] 上記[20]記載のスクリーニング方法または上記[21]記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、アンドロゲンと上記[1]記載の蛋白質

質もしくはその塩または上記〔2〕記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

〔23〕上記〔22〕記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

〔24〕アンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤である上記〔23〕記載の医薬、

〔25〕上記〔3〕記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、上記〔1〕記載の蛋白質をコードするmRNAの定量方法、

〔26〕上記〔14〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、上記〔1〕記載の蛋白質もしくはその塩または上記〔2〕記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量方法、

〔27〕上記〔25〕または〔26〕記載の定量方法を用いることを特徴とするホルモン感受性癌のアンドロゲン非依存期移行の診断方法、

〔28〕所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性である癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で培養して増殖が認められた癌細胞株を選択し、該癌細胞株におけるアンドロゲン受容体遺伝子の塩基配列を解析して該配列に変異を生じた株を選択することを特徴とする、変異アンドロゲン受容体を発現する該抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株の作出方法、

〔29〕変異部位が該抗アンドロゲン剤の投与により出現する臨床的変異部位と一致することを特徴とする上記〔28〕記載の方法、

〔30〕変異アンドロゲン受容体を発現し、且つ所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性である癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で培養して増殖が認められた癌細胞株を選択し、該癌細胞株における変異アンドロゲン受容体遺伝子の塩基配列を解析して該配列に他の変異を生じた株を選択することを特徴とする、多重変異アンドロゲン受容体を発現する該抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株の作出方法、

〔31〕抗アンドロゲン剤がフルタミドもしくはそのアナログまたはピカルタミドもしくはそのアナログである上記〔28〕～〔30〕のいずれかに記載の方法、

〔32〕上記〔28〕記載の方法により得られる変異アンドロゲン受容体を発現

する癌細胞株、

[33] 上記[30]記載の方法により得られる多重変異アンドロゲン受容体を発現する癌細胞株、

[34] アンドロゲン応答エレメントの制御下にある発現解析可能な遺伝子をさらに含有する上記[32]または[33]記載の癌細胞株、

[35] 該遺伝子が前立腺特異的抗原遺伝子または外来レポーター遺伝子である上記[34]記載の癌細胞株、

[36] 上記[32]または[33]記載の癌細胞株を被験物質の存在下で培養することを特徴とする、該癌細胞株において発現する変異アンドロゲン受容体に対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法、

[37] 上記[34]記載の癌細胞株を被験物質の存在下で培養し、該癌細胞におけるアンドロゲン応答エレメントの制御下にある遺伝子の発現を解析することの特徴とする、該癌細胞株において発現する変異アンドロゲン受容体に対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法、

[38] 上記[36]または[37]記載の方法により選択される変異アンドロゲン受容体に対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤、

[39] アンドロゲン感受性癌の細胞を被験物質の存在下で培養し、該条件下で増殖し得る癌細胞株の出現の有無を経時的に調べることを特徴とする、抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法、

[40] 上記[39]記載の方法により選択される抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤、

[41] アンドロゲン受容体の変異非誘発性または難誘発性である上記[40]記載の抗アンドロゲン剤、

[42] 上記[38]または[40]記載の抗アンドロゲン剤を含有してなる、アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤、

[43] 上記[38]または[40]記載の抗アンドロゲン剤の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、該哺乳動物におけるアンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療方法、

〔44〕 アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤の製造のための、上記〔38〕または〔40〕記載の抗アンドロゲン剤の使用、

〔45〕 異なる変異アンドロゲン受容体に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤を組み合わせる、アンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤、

〔46〕 2種以上の抗アンドロゲン剤のうちの1つが上記〔36〕または〔37〕記載の方法により選択される、上記〔45〕記載の剤、

〔47〕 異なる変異アンドロゲン受容体に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤の各有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、該哺乳動物におけるアンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療方法、

〔48〕 2種以上の抗アンドロゲン剤のうちの1つが上記〔36〕または〔37〕記載の方法により選択される、上記〔47〕記載の方法、

〔49〕 アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤の製造のための、異なる変異アンドロゲン受容体に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤の使用、

〔50〕 2種以上の抗アンドロゲン剤のうちの1つが上記〔36〕または〔37〕記載の方法により選択される、上記〔49〕記載の使用、

〔51〕 上記〔28〕記載の方法により同一の変異アンドロゲン受容体を発現する抵抗性癌細胞株を生じさせ得る抗アンドロゲン剤を1つの群として、他の変異アンドロゲン受容体を発現する抵抗性癌細胞株を生じさせ得る抗アンドロゲン剤からなる群と区分することを特徴とする、抗アンドロゲン剤の分類方法、

〔52〕 上記〔51〕記載の方法により異なる群に分類される2種以上の抗アンドロゲン剤を組み合わせる、アンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤、

〔53〕 上記〔51〕記載の方法により異なる群に分類される2種以上の抗アンドロゲン剤の各有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、該哺乳動物におけるアンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防

・治療方法、

[54] アンドロゲン依存期またはアンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療剤の製造のための、上記[51]記載の方法により異なる群に分類される2種以上の抗アンドロゲン剤の使用、および

[55] 上記[51]記載の方法によりある群に分類される抗アンドロゲン剤の有効量を長期投与することにより該抗アンドロゲン剤に対する抵抗性癌が出現した哺乳動物に、他の群に分類される抗アンドロゲン剤の有効量を投与することを特徴とする、アンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌の予防・治療方法などを提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の変異ARは、配列番号2で表わされるアミノ酸配列 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7211-7215, 1988) においてアミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンに置換されたアミノ酸配列 (「W746L」と略記する場合もある)、あるいは配列番号2で表わされるアミノ酸配列において、アミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換され、且つアミノ酸番号882のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列 (「W746L(C)+T882A」と略記する場合もある) と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質である。

本発明の変異ARは、例えば、哺乳動物 (例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) のあらゆる細胞 (例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など) や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄

、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、前立腺)に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

【0010】

W746LまたはW746L(C)+T882Aと実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、当該各アミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

W746LまたはW746L(C)+T882Aと実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、W746LまたはW746L(C)+T882Aと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、当該各アミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド(内因性リガンドであるアンドロゲンの他、他のステロイドホルモン、抗アンドロゲン剤等のアゴニストおよびアンタゴニストも含む)結合活性、細胞増殖活性、PSA(前立腺特異的抗原)等のアンドロゲン応答エレメント(ARE)制御下にある遺伝子の発現増加作用などがあげられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性、細胞増殖活性、ARE制御下の遺伝子発現増加作用などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。これらの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

より具体的には、W746Lと実質的に同質の活性としては、ピカルタミドもしくはそのアナログがアゴニスト活性を示すこと、即ちピカルタミド存在下での細胞増殖活性およびPSA発現誘導活性が挙げられる。また、W746L(C)+T882Aと実質的に同質の活性としては、W746Lと同様のピカルタミド応答に加えて、フルタミ

ドもしくはそのアナログがアゴニスト活性を示すこと、即ちフルタミド存在下での細胞増殖活性およびP S A発現誘導活性が挙げられる。

【001.1】

また、本発明の変異ARとしては、①W746LまたはW746L(C)+T882A中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②W746LまたはW746L(C)+T882Aに1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③W746LまたはW746L(C)+T882A中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列（但し、746番目（および882番目）のアミノ酸は保存されている）を含有する蛋白質なども用いられる。

【001.2】

本明細書における蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。W746LまたはW746L(C)+T882Aをはじめとする、本発明の変異ARは、C末端が通常カルボキシル基（ -COOH ）、カルボキシレート（ -COO^- ）、アミド（ -CONH_2 ）またはエステル（ -COOR ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明の変異ARがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の変異ARに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記した

C末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の変異ARには、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂-6アルカノイル基などのC₁-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂-6アルカノイル基などのC₁-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の変異ARの具体例としては、例えば、W746LまたはW746L(C)+T882Aを含有するヒト由来（より好ましくはヒト前立腺癌由来）のARなどが挙げられる。

【0013】

本発明の変異ARの部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある）としては、例えば、本発明の変異AR分子のうち、正常AR（配列番号2で表わされるアミノ酸配列およびその多型）のアンドロゲンとの結合に必要な領域に対応する部分アミノ酸配列を有するものが用いられる。ARは他の核内レセプターと同様に、N末端側から転写活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、ヒンジ領域、リガンド結合ドメインの順で配置されており、リガンド結合ドメインは配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてはアミノ酸番号672～924で示されるアミノ酸配列である。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、正常ARのアンドロゲンとの結合に必要な領域に対応する部分アミノ酸配列を有する限り特に制限はないが、少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

本発明の部分ペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するア

ミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

【0014】

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい（但し、746番目（および882番目）のアミノ酸は保存されている）。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここで、エステルにおけるRは上記と同意義を示す。

本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の変異ARと同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の変異ARまたはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩があげられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマ

ル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0015】

本発明の変異ARまたはその塩は、該変異ARを産生する能力を有する動物細胞から、自体公知のレセプター蛋白質の精製方法を用いて単離・精製することによって製造することができる。例えば、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。本発明の変異ARを産生する能力を有する動物細胞としては、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織（特に、抗アンドロゲン剤（例：ビカルタミドまたはビカルタミドおよびフルタミド）を投与された前立腺癌患者の再燃癌由来の細胞）や、正常ARもしくはT882A変異を有するARを発現する癌細胞株（例：LNCaP細胞株）を抗アンドロゲン剤（例：ビカルタミドまたはそのアナログ）の存在下で培養し、細胞増殖を指標として選択された抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株等が挙げられる。

また、本発明の変異ARまたはその塩は、後述する本発明の変異ARをコードするDNAを含む組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって製造することができる。あるいは、W746LまたはW746L(C)+T882Aのアミノ酸配列をもとにして、後述の蛋白質合成法またはこれに準じた方法により製造することもできる。

【0016】

本発明の変異ARもしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。こ

のような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0017】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

【0018】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低级アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0019】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール

、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0020】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(蛋白質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去し、た蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を

凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

【0021】

本発明の変異ARまたは本発明の部分ペプチド（以下、「本発明の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩」を単に「本発明の部分ペプチド」と、「本発明の変異ARまたはその塩」を単に「本発明の変異AR」と称する場合がある）は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の変異ARまたは本発明の変異ARを含有する蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の変異ARまたは本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年);

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年);

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年);

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年);

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店。

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の変異ARまたは本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる本発明の変異ARまたは本発明の部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公

知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0022】

本発明の変異ARをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明の変異ARをコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明の変異ARをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明の変異ARをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997等に記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明の変異ARのmRNAを定量することができる。

本発明の変異ARをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の変異ARをコードするDNAとしては、例えば、配列番号1で表わされる塩基配列において塩基番号2237の塩基がチミンに置換された塩基配列（G2237T）、あるいは配列番号1で表わされる塩基配列において塩基番号2237もしくは2238の塩基がチミンに置換され、且つ塩基番号2644の塩基がグアニンに置換された塩基配列（G2237(2238)T+A2644G）を含有するDNA、または当該塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の変異ARと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、細胞増殖活性、PSA（前立腺特異的抗原）増加作用など）を有する変異ARをコードするDNAであれば何れのものでもよい。

G2237TまたはG2237(2238)T+A2644GとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、当該各塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0023】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd Edition (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

本発明の変異ARをコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明の変異AR遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンスヌクレオチド(核酸)を、クローン化したあるいは決定された本発明の変異ARをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成する。そうしたヌクレオチド(核酸)は、温度条件等を精確に制御すれば本発明の変異AR遺伝子のRNAと特異的にハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいは本発明の変異AR関連RNAとの相互作用を介して本発明の変異AR遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のAR関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及び本発明の変異AR関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるヌクレオチドは、生体内及び生体外で本発明の変異AR遺伝子の発現を調節・制御

するのに有用であり、また病気、特にホルモン感受性癌（例：前立腺癌）のアンドロゲン依存期およびアンドロゲン非依存期における治療又はアンドロゲン非依存期への移行（再燃）の診断に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。本発明の変異AR遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パ lindローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、変異AR遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0024】

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なヌクレオチドとの関係、即ち、対象物とハイブリダイズすることができるヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などがあげられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルア

ミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えば蛋白質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 α アノマー型の核酸など)であってよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0025】

本発明のアンチセンスヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものがあげられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計される。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 な

どに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものがあげられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）があげられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものがあげられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基があげられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明の変異ARの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

【0026】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅す

ることもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）G2237TまたはG2237(2238)T+A2644Gを有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または（2）当該各塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の部分ペプチドと実質的に同質の活性（例：リガンド結合活性、細胞増殖活性、PSA（前立腺癌特異的抗原）増加作用）を有する変異ARをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

G2237TまたはG2237(2238)T+A2644GとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、当該各塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0027】

本発明の変異ARまたはその部分ペプチド（以下、これらを単に本発明の変異ARと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の変異ARの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の変異ARの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd Edition（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0028】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された変異ARをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の変異ARの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明の変異ARをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0029】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P1

0プロモーターなどが好ましい。

【0030】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のARのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の変異ARをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0031】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U S A）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ,（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Bio

logy)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

【0032】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0033】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ARをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子など

を添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

【0034】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0035】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻,

501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外に本発明の変異ARを生成せしめることができる。

【0036】

上記培養物から本発明の変異ARを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の変異ARを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明の変異ARの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明の変異ARが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のARの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法な

どが用いられる。

【0037】

かくして得られる本発明の変異ARが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明の変異ARを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の変異ARまたはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および本発明の抗体（以下に詳述）を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0038】

本発明の変異ARに対する抗体は、本発明のARを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の変異ARに対する抗体は、本発明の変異ARを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0039】

本発明の抗体は、本発明の変異ARを特異的に認識するが正常ARを認識しないことを特徴とする。したがって、用いる抗原としては、配列番号2のアミノ酸番号746およびその近傍の部分アミノ酸配列、および／またはアミノ酸番号882およびその近傍の部分アミノ酸アミノ酸配列を含むペプチドが好ましい。

本発明の別の抗体は、配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号746のトリプトファンがロイシンもしくはシステインに置換されたアミノ酸配列(W746L(C))と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を特異的に認識するが、配列番号2で表わされるアミノ酸配列においてアミノ酸番号882のスレオニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列（

T882A) と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を認識しない抗体である。本発明のさらに別の抗体は、T882Aと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を特異的に認識するが、W746L(C)と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩を認識しない抗体である。これらの抗体は、それぞれが認識する変異ARの変異部位およびその近傍の部分アミノ酸配列を抗原として作製することができる。

【0040】

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の変異ARは、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化変異ARと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)

数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1 : 1 ~ 20 : 1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000 ~ PEG6000）が10 ~ 80 %程度の濃度で添加され、約20 ~ 40℃、好ましくは約30 ~ 37℃で約1 ~ 10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0041】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明の変異ARの抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した変異ARを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1 ~ 20 %、好ましくは10 ~ 20 %の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1 ~ 10 %の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20 ~ 40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日 ~ 3週間、好ましくは1週間 ~ 2週間である。培養は、通常5 %炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0042】

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿

法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法]に従って行なうことができる。

【0043】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明の変異ARの抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の変異ARに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル

抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0044】

本発明の変異ARまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩をコードするDNAは、(1) 本発明の変異ARの過剰発現により改善され得る疾患の予防および/または治療剤、(2) 遺伝子診断剤、(3) 本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(4) 本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(5) 本発明の変異ARとリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法、(6) 本発明の変異ARとリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(7) 本発明の変異ARの定量、(8) 本発明の抗体を含有する医薬、(9) アンチセンスDNAを含有する医薬、(10) DNA転移動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の変異ARを発現し得る動物細胞や組換え型変異ARの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なレセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明の変異AR、本発明の変異ARをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明の変異ARに対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

【0045】

(1) 本発明の変異ARの過剰発現により改善され得る疾患の予防および/または治療剤

本発明の変異ARは、ピカルタミドもしくはそのアナログ、あるいはさらにフルタミドもしくはそのアナログがアゴニストとして作用することを特徴とする。前立腺癌ではARの刺激が過剰に入ると逆に増殖が抑制されることが知られてい

るので、①本発明の変異ARまたは②本発明のDNAを癌細胞限局的に送達して過剰に存在させることにより、抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞の増殖を抑制することが可能である。

本発明の変異ARを上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明の変異ARまたは②本発明のDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の変異ARまたは②本発明のDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0046】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出

植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0047】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイニンなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の変異ARの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）に

においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0048】

(2) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明の変異ARをコードするDNAまたはmRNA（即ち、正常AR遺伝子またはmRNAの異常）を検出することができるので、癌の遺伝子診断剤、特に抗アンドロゲン剤（例：ピカルタミド、フルタミド等）に対する抵抗性を獲得した癌細胞の出現・増加などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス (Genomics) , 第5巻, 874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

【0049】

(3) 本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる本発明

の変異ARのmRNA量を測定することによる、本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0050】

本発明の変異ARのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常ARあるいは本発明の変異ARを発現する細胞を有する非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、）に対して薬剤あるいは物理的ストレスなどを与え、一定時間経過した後、血液、あるいは特定の臓器、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた細胞に含まれる本発明の変異ARのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えばTaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) 本発明の変異ARを発現する形質転換体または本発明の変異ARを発現し得る動物細胞を前述の方法に従って作製し、該形質転換体または上記動物細胞に含まれる本発明のARのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

【0051】

本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常ARあるいは本発明の変異ARを発現する細胞を有する非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞に含まれる本発明の変異ARのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体または本発明の変異ARを発現する能力を有する動物細胞を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3

日後)、該形質転換体または本発明の変異ARを発現する能力を有する動物細胞に含まれる本発明の変異ARのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

【0052】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明の変異ARの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)本発明の変異ARの発現量を増加させることにより、本発明の変異ARを介する細胞刺激活性(例えば、細胞増殖刺激、PSA発現誘導活性など)を過剰に増強させる化合物、(ロ)本発明の変異ARの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を過剰に増強させる化合物は、例えば抗アンドロゲン剤と併用することにより、抗アンドロゲン剤抵抗性癌の増殖を抑制することができ、アンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌(例えば、前立腺癌等)の予防・治療剤として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明の変異ARの生理活性を減少させるため、アンドロゲン非依存期のホルモン感受性癌(例えば、前立腺癌等)の予防・治療剤として有用である。

【0053】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って使用することができる。例えば、上記した本発明の変異ARを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法など

により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0054】

（4）本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明の変異ARの発現量を変化させる化合物は、ホルモン依存性およびホルモン非依存性の癌（例：前立腺癌など）の予防・治療剤として用いることができる。該化合物は常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0055】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさ

らに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0056】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0057】

(5) 本発明の変異ARとリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

本発明の変異ARを用いるか、または組換え型変異ARの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明の変異ARとの結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）本発明の変異ARを介して細胞刺激活性（例えば、細胞増殖活性、PSA発現誘導活性など）を促進する活性を有する化合物（いわゆる、本発明の変異ARに対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の変異ARに対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明の変異ARとの結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明の変異ARとの結合力を減少させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、（i）本発明の変異ARと、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明の変異ARと、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明の変異ARとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、本発明のARに対するリガンド（アンドロゲン）の結合量、細胞刺激活性（例：細胞増殖活性、PSA発現誘導活性）などを測定して、比較することを特徴とする。

【0058】

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明の変異ARに接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の変異ARに接触させた場合における、標識したリガンドの該変異ARに対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の変異ARとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明の変異ARを含有する細胞（変異ARを発現し得る能力を有する動物細胞など）に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の変異ARを含有する細胞（変異ARを発現し得る能力を有する動物細胞など）に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって発現した変異ARに接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって発現した本発明の変異ARに接触させた場合における、標識したリガンドの該変異ARに対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

④本発明の変異ARを活性化する化合物（例えば、アンドロゲンまたはピカルタミド、フルタミドなどの抗アンドロゲン剤など）を本発明の変異ARを含有する細胞（変異ARを発現し得る能力を有する動物細胞など）に接触させた場合と、本発明の変異ARを活性化する化合物および試験化合物を本発明の変異ARを含有する細胞（変異ARを発現し得る能力を有する動物細胞など）に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、細胞増殖活性、PSA発現誘導活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0059】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の変異ARとしては、上記した本発明の変異ARを含有するものであれば何れのものであってもよいが、前記した本発明の変異ARを発現し得る能力を有する動物細胞などが好適である。

【0060】

本発明の変異ARを製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とす

る蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のARをコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の変異ARを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した変異ARであってもよいし、該変異ARを含有する細胞を用いてもよい。

【0061】

本発明のスクリーニング方法において、本発明の変異ARを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の変異ARを含有する細胞としては、該変異ARを発現した宿主細胞というが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

該変異ARを含有する細胞中の変異ARの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほどリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0062】

リガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる化合物をスクリーニング

する上記の①～③を実施するためには、例えば、適当な変異AR画分と、標識したリガンドが必要である。

変異AR画分としては、自然または人為的突然変異により得られる変異AR発現細胞由来のAR画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型変異AR画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、細胞刺激活性などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド（アンドロゲン）、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたテストステロン、DHTなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明の変異ARとの結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明の変異ARを含有する細胞を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより変異AR標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと変異ARとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4}M ～ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）

）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0063】

リガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の④の方法のうち、最も好ましい態様については後で詳述する。

一般的には、まず、本発明の変異ARを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞の増殖度を評価するか、あるいは細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、PSAなど）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な変異ARを発現した細胞が必要である。本発明の変異ARを発現した細胞としては、自然または人為的突然変異により得られる変異AR発現細胞、前述の組換え型変異ARを発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0064】

リガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の変異ARまたは本発明の変異ARを含有する細胞（変異ARを発現し得る能力を有する動物細胞など）を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②変異AR標品

本発明の変異ARを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などと標識したDHT溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

④リガンド標準液

DHTを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0065】

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の変異AR発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識リガンドを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μl 加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0066】

〔数1〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

【0067】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明の変異ARとの結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 本発明のARを介して細胞刺激活性(例えば、細胞増殖活性、PSA産生など)を有する化合物(いわゆる、本発明の変異ARに対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明の変異ARに対するアンタゴニスト)、(ハ) リガンドと本発明の変異ARとの結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドと本発明の変異ARとの結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよい、公知の化合物であってもよい。

本発明の変異ARに対するアンタゴニストは、本発明の変異ARに対するリガンド(アンドロゲン)およびアゴニスト(ビカルタミド、フルタミドなどの一部の抗アンドロゲン剤等)が有する生理活性を抑制することができるので、アンドロゲン依存性(抗アンドロゲン剤抵抗性)癌、特に前立腺癌の予防・治療剤として有用である。

リガンドと本発明の変異ARとの結合力を減少させる化合物は、本発明の変異ARに対するリガンド(アゴニスト)が有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬(例えば、アンドロゲン依存性(抗アンドロゲン剤抵抗性)癌、特に前立腺癌の予防・治療剤)として有用である。

【0068】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って

製造・使用することができる。例えば、上記した本発明の変異ARを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとしてすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0069】

(6) 本発明の変異ARとリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明の変異ARに対するアンタゴニストは、本発明の変異ARに対するリガンド（アンドロゲン）およびアゴニスト（ビカルタミド、フルタミドなどの一部の抗アンドロゲン剤等）が有する生理活性を抑制することができるので、アンドロゲン依存性（抗アンドロゲン剤抵抗性）癌、特に前立腺癌の予防・治療剤として用いることができる。該化合物を上記疾患に使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた

製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0070】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0071】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）

に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0072】

（7）本発明の変異ARの定量

本発明の抗体は、本発明のARを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の変異ARの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明の変異ARとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明の変異ARの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の変異ARの定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の変異ARの定量法を提供する。

【0073】

本発明の変異ARに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の変異ARの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明の変異ARに対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、変異AR量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により

検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0074】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の変異AR量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明の変異ARの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明の変異ARの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。

【0075】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0076】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の変異ARの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54

年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」 Vol. 70 (Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のARまたはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明の変異ARを定量することによって、本発明の変異ARの出現・増加に関連する疾患、例えばアンドロゲン非依存性(抗アンドロゲン剤抵抗性)癌、特に前立腺癌の診断をすることができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の変異ARを特異的に検出するために使用することができる。また、本発明の変異ARを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の変異ARの検出、被検細胞内における本発明の変異ARの挙動の分析などのために使用することができる。

【0077】

(8) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の変異ARに対する抗体が有する本発明の変異ARに対する中和活性とは、本発明の変異ARの関与する細胞刺激活性を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該変異ARの関与する細胞刺激活性(例えば、細胞増殖活性、PSA産生など)を不活性化することができる。従って、該変異ARの細胞増殖刺激などに起因する疾患、例えばアンドロゲン非依存性(抗アンドロゲン剤抵抗性)癌、特に前立腺癌の予防および/または治療に用

いることができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の癌患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常 $0.01 \sim 20 \text{ mg/kg}$ 体重程度、好ましくは $0.1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ 体重程度、さらに好ましくは $0.1 \sim 5 \text{ mg/kg}$ 体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【0078】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理

食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0079】

(9) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、該変異ARの関与する細胞刺激活性（例えば、細胞増殖活性、PSA産生など）を翻訳レベルでブロックすることができる。従って、該変異ARの細胞増殖刺激などに起因する疾患、例えばアンドロゲン非依存性（抗アンドロゲン剤抵抗性）癌、特に前立腺癌の予防および／または治療に用いることができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは

摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0080】

(10) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明の変異ARをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、

また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0081】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している変異AR遺伝子ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0082】

本発明のARの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモータ

一、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンⅠⅠ、ウロプラキニンⅠⅠ、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンⅠ型およびⅡ型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼβⅠサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインⅠおよびⅡA、メタロプロテイナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスⅠ抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

【0083】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域

の3'下流に連結することも目的により可能である。

本発明の変異ARの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）のアンドロゲン非依存性癌、特に前立腺癌由来の細胞、あるいは後述の本発明の作出方法により得られる抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株から単離したDNAよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または上記細胞（株）由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。あるいは、正常ARの翻訳領域を常法に従って単離し、点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

【0084】

本発明の外来性DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0085】

本発明の外来性DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の外来性DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に正常ARの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の外来性DNA転移動物を用いて、アンドロゲン非依存性（抗アンドロゲン剤抵抗性）癌、特に前立腺癌の病態機序の解明

およびこの疾患の予防・治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチドを分析することによる、本発明の変異ARにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異ARを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、正常ARの機能不活性型不応症などを含む、ARに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のARに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明の蛋白質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のARおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、正常ARの機能不活性型不応症を含む、本発明のARに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のARが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0086】

本発明はまた、所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性である癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で培養して増殖が認められた癌細胞株を選択し、該癌細胞株におけるAR遺伝子の塩基配列を解析して該配列に変異を生じた株を選択することを特徴とする、変異ARを発現する該抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株の作出方法を提供する。

【0087】

出発材料の癌細胞としては、所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性である限り特に制限はなく、正常AR（例えば、配列番号2で表わされるアミノ酸配列を有する）を発現する癌細胞、好ましくは前立腺癌細胞、あるいは他の抗アンドロゲン剤に対して抵抗性である変異ARを発現する癌細胞などが挙げられる。ここで「所定の抗アンドロゲン剤に対して感受性（抵抗性）である」とは、該抗アンドロゲン剤の存在下で増殖し得ない（増殖し得る）ことを意味する。正常ARを発現する癌細胞としては、アンドロゲン依存性癌患者から得られた生検サンプルや摘除された前立腺由来の癌細胞が挙げられ、変異ARを発現する細胞としては他の抗アンドロゲン剤による内分泌療法後にアンドロゲン非依存性癌が再燃した患者由来の癌細胞、あるいはLNCaP細胞株（T882Aの変異ARを発現する）が例示される。

【0088】

癌細胞の培養は、通常の動物細胞の培養に使用される方法を用いて、または適宜変更を加えて行なうことができる。培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地【サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地【ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地【ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地【プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。血清中に含まれるアンドロゲンもしくは他のステロイドにより細胞増殖が誘発さ

れる可能性があるので、デキストランでコーティングしたチャコールで予め処理した血清を用いることが好ましい。しかしながら、他のステロイドホルモンがアゴニストとして作用することを許容するようなARの変異をも選択するためには、無処理の血清含有培地を用いることもまた好ましい。培地のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

例えば、癌細胞を0.0001～100μMの抗アンドロゲン剤（例えば、フルタミド、ピカルタミド、ニルタミド等）を含む上記いずれかの培地に1～1,000,000細胞/mlとなるように加え、マルチウェルプレート等の培養器中で、上記の培養条件下で培養する。常法に従って適当な間隔で培地交換を行いながら細胞増殖の有無を経時的に観察する。細胞増殖が認められたクローンからRNAを単離し、例えば、公知の正常AR cDNA配列を基に作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとしてRT-PCR法を用いてARのcDNAを増幅・単離し、その塩基配列をダイレクトシーケンスもしくは適当なベクターにサブクローニングした後で解析することにより、実際にARに変異を生じたクローンを選択する。

【0089】

上記のようにして得られる変異ARの変異部位は、選択圧として用いた抗アンドロゲン剤の種類によって特徴的であり、例えば、ピカルタミドを用いた場合は配列番号2で表わされるアミノ酸配列中のアミノ酸番号746のトリプトファンに変異が集中し（好ましくはロイシンもしくはシステインに置換される）、フルタミドを用いた場合は配列番号2で表わされるアミノ酸配列中のアミノ酸番号882のスレオニンに変異が集中する（好ましくはアラニンに置換される）。これらの変異部位は、各抗アンドロゲン剤を用いた内分泌療法に対する再燃癌から臨床的に明らかにされている変異部位とよく一致する。

【0090】

出発材料として変異ARを発現する癌細胞（例えば、LNCaP細胞等）を用いた場合、他の部位にさらに変異を有する多重変異AR発現癌細胞株を作出することができる。したがって、本発明は、変異ARを発現し、且つ所定の抗アンドロゲ

ン剤に対して感受性である癌細胞を該抗アンドロゲン剤の存在下で培養して増殖が認められた癌細胞株を選択し、該癌細胞株における変異AR遺伝子の塩基配列を解析して該配列に他の変異を生じた株を選択することを特徴とする、多重変異ARを発現する該抗アンドロゲン剤抵抗性癌細胞株の作出方法を提供する。

【0091】

ARは特定の標的遺伝子の転写を活性化する転写因子活性を有する核内レセプターであるので、変異ARに対するアゴニストもしくはアンタゴニスト活性は、当該標的遺伝子の発現を解析することにより容易に検定することができる。ARの標的遺伝子としては、アンドロゲン応答エレメント(ARE)と呼ばれるコンセンサス配列をプロモーターのさらに上流に有する遺伝子群が挙げられ、PSAやカリクレインがその代表例である。

使用される癌細胞が哺乳動物由来の前立腺癌細胞株であれば、本発明の方法により作出される変異AR発現癌細胞株は内因性PSA遺伝子を有するので、変異ARに対するアゴニストもしくはアンタゴニスト活性は、抗PSA抗体やPSAもしくはその一部をコードするDNAを用いて測定・評価することができる。

あるいは、得られた癌細胞株にAREの制御下にあるレポーター蛋白質をコードするDNAを導入して該レポーター蛋白質の発現を調べることによっても、変異ARに対するアゴニストもしくはアンタゴニスト活性を評価することができる。レポーター蛋白質としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ペルオキシダーゼ等が使用できる。レポーター蛋白質をコードするDNAは、上述の動物細胞発現用ベクター中に挿入して、上述の遺伝子導入法を用いて導入され得る。

【0092】

所定の抗アンドロゲン剤(例：フルタミド)に対して抵抗性の変異AR発現癌細胞は、他のある種の抗アンドロゲン剤(例：ピカルタミド)に対しては依然として感受性であることから、上記のようにして得られる変異AR発現癌細胞株を被験物質の存在下で培養し、該変異ARに対する作用を調べることにより、既存の抗アンドロゲン剤に対して抵抗性となった再燃癌の増殖を抑制し得る他のタイプの抗アンドロゲン剤をスクリーニングすることができる。したがって、本発明

はまた、上記のようにして得られる変異AR発現癌細胞株を被験物質の存在下で培養することを特徴とする、該癌細胞株において発現する変異ARに対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法を提供する。変異ARに対する拮抗作用は、細胞増殖を指標として検出することもできるが、該変異ARによって転写活性化される遺伝子の発現を解析することにより、より短時間で検出・評価することができる。用いられる遺伝子としては、上述のようなPSA遺伝子やAREの制御下にあるレポーター遺伝子が挙げられる。

【0093】

本発明はまた、上記の方法により選択される変異ARに対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤を提供する。例えば、本発明の多重変異ARであるW746L(C)+T882Aはピカルタミドおよびフルタミドの両方に対して抵抗性を有するが、後記実施例に示される化合物Aは、このような既存の抗アンドロゲン剤が無効な変異ARに対してもアンタゴニスト活性を発揮する。

【0094】

本発明の変異AR発現癌細胞株の作出方法において公知の抗アンドロゲン剤（例えば、ピカルタミドやフルタミドなど）を用いた場合、遅くとも約3ヶ月程度で変異ARを発現する抗アンドロゲン剤抵抗性株が樹立され得る。しかしながら、化合物の種類によってはさらに長期間培養を続けても細胞増殖を誘発しない場合が予測される。このような化合物は、抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤として有用である。したがって、本発明はまた、アンドロゲン感受性癌の細胞を被験物質の存在下で培養し、該条件下で増殖し得る癌細胞株の出現の有無を経時的に調べることを特徴とする、抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法、並びに当該方法により選択される抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤を提供する。

【0095】

本発明は、上記のスクリーニング法によって得られる変異ARに対して拮抗作用を示す抗アンドロゲン剤を含有してなるホルモン感受性癌、好ましくは前立腺癌の予防・治療剤を提供する。かかる抗アンドロゲン剤は正常および変異ARの両方に対してアンドロゲンと拮抗作用を示すので、アンドロゲン依存期およびア

ンドロゲン非依存期の両方で癌細胞の増殖を抑制し得る。

本発明はまた、上記のスクリーニング法によって得られる抵抗性癌非誘発性または難誘発性の抗アンドロゲン剤を含有してなるホルモン感受性癌、好ましくは前立腺癌の予防・治療剤を提供する。かかる抗アンドロゲン剤は該薬剤に対する抵抗性を与えるような変異をARに生じさせないか、あるいは他の抗アンドロゲン剤に比べて有意に生じさせにくいので、アンドロゲン非依存性癌への移行を遅延させるのに有用である。

【0096】

上記予防・治療剤は常套手段に従って製造・使用することができる。例えば、上記した本発明の変異ARを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0097】

本発明はまた、異なる変異ARに対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤を組み合わせたカクテル療法剤を提供する。これまでにARの変異に関する報告は数多くなされているが、2箇所以上のアミノ酸の変異を有する変異ARの報告例は極めて少ない。したがって、異なる変異AR（例：W746L（

C)およびT882A) に対して抗アンドロゲン作用を示す2種以上の抗アンドロゲン剤(例:ピカルタミドおよびフルタミド)を併用すれば、どちらか一方の変異を有する癌細胞が出現しても、それらはいずれかの抗アンドロゲン剤に対して感受性であるため増殖することができず、長期間アンドロゲン非依存性への移行が遅延され得る。

カクテル療法剤としては、各抗アンドロゲン剤を上記の方法に従って製剤化し、これらを同時に投与してもよいし、2種以上の抗アンドロゲン剤を1つの製剤中に配合してもよい。

抗アンドロゲン剤の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につきそれぞれ約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につきそれぞれ約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0098】

上記のようなカクテル療法の実施に際しては、各種の抗アンドロゲン剤がどのような変異ARを誘発し易いのかを知ることが重要である。本発明の変異AR発現癌細胞株の作出方法は、かかる抗アンドロゲン剤のタイピングに有用である。即ち、各種の抗アンドロゲン剤について当該方法を実施して得られる変異ARを分析して該抗アンドロゲン剤により誘発され易い変異部位を特定し、同一の変異ARを発現する抵抗性癌細胞株を生じさせる抗アンドロゲン剤(例:フルタミド、ニルタミドなど)を1つの群として、他の変異ARを発現する抵抗性癌細胞株を生じさせる抗アンドロゲン剤(例:ピカルタミドなど)からなる群と区分する。かかる分類方法により異なる群に分類された任意の抗アンドロゲン剤の2種以上の組み合わせることにより、効果的なカクテル療法を実施することができる。

【0099】

上記の抗アンドロゲン剤の分類方法により得られた情報は、1種の抗アンドロゲン剤を抵抗性癌が出現するまで継続投与し、その後該抗アンドロゲン剤とは異なる群に分類された他の抗アンドロゲン剤を投与して出現した抵抗性癌の増殖を阻止するという、シーケンシャルな内分泌療法を行なう上でも有用である。

【0100】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0101】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン

Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0102】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル

Bz1	: ベンジル
Cl ₂ Bz1	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェノール
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOBT	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0103】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号1〕

野生型ヒトARのcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号2〕

野生型ヒトARのアミノ酸配列を示す。

【0104】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0105】

実施例1 LNCaP-cx細胞株の樹立方法

LNCaP-FGC (ATCC番号: CRL-1740) を0.1および1 μ Mのビカルタミド (商品名:

カソデックス)を含む培養液(RPMI1640+10% Dextran Charcoal (DCC)-Fetal Bovine Serum (FBS))中で培養すると最初は増殖しない。しかし、6週間から13週間以上培養を継続すると増殖を示す細胞株が2系統得られた。これらの細胞をそれぞれLNCaP-cxD11およびLNCaP-cxD2と名づけた。

【0106】

実施例2 LNCaP-cxD細胞株のビカルタミド応答

LNCaP-cxD11、LNCaP-cxD2およびLNCaP-FGCを24穴プレートに40000 cells/mL/wellで播き、翌日0.1-30 μ Mのビカルタミドを添加し、添加3日後に細胞数を計測した。また、この時、アンドロゲン依存的に産生されるPSA(Prostatic Specific Antigen)の培養上清中濃度を測定した。

その結果、LNCaP-cxD11およびLNCaP-cxD2の増殖はビカルタミドにより有意に促進された〔図1〕。一方、親株LNCaP-FGCではビカルタミドにより有意に増殖が抑制された〔図1〕。また、PSA産生についても、LNCaP-cxD11およびLNCaP-cxD2ではビカルタミドにより有意に促進され、親株ではビカルタミドにより有意に抑制された〔図2〕。

【0107】

実施例3 変異ARの同定

LNCaP-cxD11、LNCaP-cxD2およびLNCaP-FGCから全RNAを抽出後cDNAにし、AR遺伝子の塩基配列をPCRダイレクトシーケンス法により解析した。LNCaP-cxD11についてはAR遺伝子のアンドロゲン結合領域の部分のみ配列解析した。

その結果、LNCaP-cxD11およびLNCaP-cxD2のいずれのARにもアンドロゲン結合領域にアミノ酸の変異を伴う遺伝子配列の変異が一つずつ入っていた。コドン746(通常、AR全コドン数を919とする表記を用いるが、その表記ではコドン741に相当)のTGG(トリプトファン)がLNCaP-cxD11およびLNCaP-cxD2でそれぞれTTG(ロイシン)およびTGT(システイン)へ変異していた。

【0108】

実施例4 ビカルタミドによる変異型ARの転写促進活性

Cos-7を150cm²フラスコに5,000,000 cells播き、培養液(DMEM+10% Dextran Charcoal (DCC)-Fetal Bovine Serum (FBS)+2mM glutamine)中で24時間培養後、

野生型ARあるいは変異型AR (W741CおよびW741L型変異) を挿入したベクターDNA およびアンドロゲン応答性プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたベクターDNAをリポソーム法によってコトランスフェクションした。2時間後に培地交換し、3時間培養後、0.01あるいは1 μ Mのピカルタミドを添加し、さらに24時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定し、ピカルタミドによるARの転写活性を調べた。

その結果、野生型に対してピカルタミドはほとんど転写活性を示さなかったが、W741CおよびW741L型変異ARに対してピカルタミドは転写促進活性を示した〔図3〕。

【0109】

実施例5 W741C型変異ARに対しアンタゴニスト作用を示す化合物のスクリーニング

DHT(ジヒドロテストステロン)によるW741C型変異ARの転写活性を阻害する化合物、つまり、W741C型変異ARに対しアンタゴニスト作用を示す化合物を実施例4に記したアッセイ系と同様のコトランスフェクション系により探索した結果、化合物A [エチル 2,5-ジメチル-4-(4-ニトロフェニル)-1H-ピロール-3-カルボキシレート (ラボテスト社製)] を見出した〔図4〕。

【0110】

【発明の効果】

本発明の方法により、アンドロゲン非依存性の再燃前立腺癌に対して有効な予防・治療薬をスクリーニングすることができる。また、アンドロゲン非依存性癌の出現(再燃)を早期に発見することができる。さらに、本発明により導出される新規な内分泌療法を適用することにより、前立腺癌の延命率および期間を大いに改善することが期待される。

【0111】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Mutated Androgen Receptor, Cancer Cells Expressing Same,
Production Method Thereof and Use Thereof

<130> B02173

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2775

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2775)

<223>

<400> 1

atg gaa gtg cag tta ggg ctg gga agg gtc tac cct cgg ccg ccg tcc	48
Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser	
1 5 10 15	
aag acc tac cga gga gct ttc cag aat ctg ttc cag agc gtg cgc gaa	96
Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu	
20 25 30	
gtg atc cag aac ccg ggc ccc agg cac cca gag gcc gcg agc gca gca	144
Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala	

35	40	45	
cct ccc ggc gcc agt ttg ctg ctg ctg cag cag cag cag cag cag cag			192
Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln			
50	55	60	
cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag			240
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln			
65	70	75	80
cag cag cag caa gag act agc ccc agg cag cag cag cag cag cag ggt			288
Gln Gln Gln Gln Glu Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly			
85	90	95	
gag gat ggt tct ccc caa gcc cat cgt aga ggc ccc aca ggc tac ctg			336
Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu			
100	105	110	
gtc ctg gat gag gaa cag caa cct tca cag ccg cag tcg gcc ctg gag			384
Val Leu Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu			
115	120	125	
tgc cac ccc gag aga ggt tgc gtc cca gag cct gga gcc gcc gtg gcc			432
Cys His Pro Glu Arg Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala			
130	135	140	
gcc agc aag ggg ctg ccg cag cag ctg cca gca cct ccg gac gag gat			480
Ala Ser Lys Gly Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp			
145	150	155	160
gac tca gct gcc cca tcc acg ttg tcc ctg ctg ggc ccc act ttc ccc			528
Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro			
165	170	175	
ggc tta agc agc tgc tcc gct gac ctt aaa gac atc ctg agc gag gcc			576
Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala			
180	185	190	
agc acc atg caa ctc ctt cag caa cag cag cag gaa gca gta tcc gaa			624

Ser Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu
 195 200 205
 ggc agc agc agc ggg aga gcg agg gag gcc tcg ggg gct ccc act tcc 672
 Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser
 210 215 220
 tcc aag gac aat tac tta ggg ggc act tcg acc att tct gac aac gcc 720
 Ser Lys Asp Asn Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala
 225 230 235 240
 aag gag ttg tgt aag gca gtg tcg gtg tcc atg ggc ctg ggt gtg gag 768
 Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu
 245 250 255
 gcg ttg gag cat ctg agt cca ggg gaa cag ctt cgg ggg gat tgc atg 816
 Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met
 260 265 270
 tac gcc cca ctt ttg gga gtt cca ccc gct gtg cgt ccc act cct tgt 864
 Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys
 275 280 285
 gcc cca ttg gcc gaa tgc aaa ggt tct ctg cta gac gac agc gca ggc 912
 Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly
 290 295 300
 aag agc act gaa gat act gct gag tat tcc cct ttc aag gga ggt tac 960
 Lys Ser Thr Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr
 305 310 315 320
 acc aaa ggg cta gaa ggc gag agc cta ggc tgc tct ggc agc gct gca 1008
 Thr Lys Gly Leu Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala
 325 330 335
 gca ggg agc tcc ggg aca ctt gaa ctg ccg tct acc ctg tct ctc tac 1056
 Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr
 340 345 350

aag tcc gga gca ctg gac gag gca gct gcg tac cag agt cgc gac tac 1104
Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr
355 360 365
tac aac ttt cca ctg gct ctg gcc gga ccg ccg ccc cct ccg ccg cct 1152
Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
370 375 380
ccc cat ccc cac gct cgc atc aag ctg gag aac ccg ctg gac tac ggc 1200
Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly
385 390 395 400
agc gcc tgg gcg gct gcg gcg gcg cag tgc cgc tat ggg gac ctg gcg 1248
Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala
405 410 415
agc ctg cat ggc gcg ggt gca gcg gga ccc ggt tct ggg tca ccc tca 1296
Ser Leu His Gly Ala Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser
420 425 430
gcc gcc gct tcc tca tcc tgg cac act ctc ttc aca gcc gaa gaa ggc 1344
Ala Ala Ala Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly
435 440 445
cag ttg tat gga ccg tgt ggt ggt ggt ggg ggt ggt ggc ggc ggc ggc 1392
Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
450 455 460
ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc gag gcg gga 1440
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly
465 470 475 480
gct gta gcc ccc tac ggc tac act cgg ccc cct cag ggg ctg gcg ggc 1488
Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly
485 490 495
cag gaa agc gac ttc acc gca cct gat gtg tgg tac cct ggc ggc atg 1536
Gln Glu Ser Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met

500	505	510	
gtg agc aga gtg ccc tat ccc agt ccc act tgt gtc aaa agc gaa atg			1584
Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met			
515	520	525	
ggc ccc tgg atg gat agc tac tcc gga cct tac ggg gac atg cgt ttg			1632
Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu			
530	535	540	
gag act gcc agg gac cat gtt ttg ccc att gac tat tac ttt cca ccc			1680
Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro			
545	550	555	560
cag aag acc tgc ctg atc tgt gga gat gaa gct tct ggg tgt cac tat			1728
Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr			
565	570	575	
gga gct ctc aca tgt gga agc tgc aag gtc ttc ttc aaa aga gcc gct			1776
Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala			
580	585	590	
gaa ggg aaa cag aag tac ctg tgc gcc agc aga aat gat tgc act att			1824
Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile			
595	600	605	
gat aaa ttc cga agg aaa aat tgt cca tct tgt cgt ctt cgg aaa tgt			1872
Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys			
610	615	620	
tat gaa gca ggg atg act ctg gga gcc cgg aag ctg aag aaa ctt ggt			1920
Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly			
625	630	635	640
aat ctg aaa cta cag gag gaa gga gag gct tcc agc acc acc agc ccc			1968
Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro			
645	650	655	
act gag gag aca acc cag aag ctg aca gtg tca cac att gaa ggc tat			2016

Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr	
660 665 670	
gaa tgt cag ccc atc ttt ctg aat gtc ctg gaa gcc att gag cca ggt	2064
Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly	
675 680 685	
gta gtg tgt gct gga cac gac aac aac cag ccc gac tcc ttt gca gcc	2112
Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala	
690 695 700	
ttg ctc tct agc ctc aat gaa ctg gga gag aga cag ctt gta cac gtg	2160
Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val	
705 710 715 720	
gtc aag tgg gcc aag gcc ttg cct ggc ttc cgc aac tta cac gtg gac	2208
Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp	
725 730 735	
gac cag atg gct gtc att cag tac tcc tgg atg ggg ctc atg gtg ttt	2256
Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe	
740 745 750	
gcc atg ggc tgg cga tcc ttc acc aat gtc aac tcc agg atg ctc tac	2304
Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr	
755 760 765	
ttc gcc cct gat ctg gtt ttc aat gag tac cgc atg cac aag tcc cgg	2352
Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg	
770 775 780	
atg tac agc cag tgt gtc cga atg agg cac ctc tct caa gag ttt gga	2400
Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly	
785 790 795 800	
tgg ctc caa atc acc ccc cag gaa ttc ctg tgc atg aaa gca ctg cta	2448
Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu	
805 810 815	

ctc ttc agc att att cca gtg gat ggg ctg aaa aat caa aaa ttc ttt 2496
 Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe
 820 825 830
 gat gaa ctt cga atg aac tac atc aag gaa ctc gat cgt atc att gca 2544
 Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala
 835 840 845
 tgc aaa aga aaa aat ccc aca tcc tgc tca aga cgc ttc tac cag ctc 2592
 Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu
 850 855 860
 acc aag ctc ctg gac tcc gtg cag cct att gcg aga gag ctg cat cag 2640
 Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln
 865 870 875 880
 ttc act ttt gac ctg cta atc aag tca cac atg gtg agc gtg gac ttt 2688
 Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe
 885 890 895
 ccg gaa atg atg gca gag atc atc tct gtg caa gtg ccc aag atc ctt 2736
 Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu
 900 905 910
 tct ggg aaa gtc aag ccc atc tat ttc cac acc cag tga 2775
 Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
 915 920

<210> 2

<211> 924

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu
 20 25 30
 Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala
 35 40 45
 Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 50 55 60
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 65 70 75 80
 Gln Gln Gln Gln Glu Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly
 85 90 95
 Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu
 100 105 110
 Val Leu Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu
 115 120 125
 Cys His Pro Glu Arg Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala
 130 135 140
 Ala Ser Lys Gly Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp
 145 150 155 160
 Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro
 165 170 175
 Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala
 180 185 190
 Ser Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu
 195 200 205
 Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser
 210 215 220
 Ser Lys Asp Asn Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala

225 230 235 240
 Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu
 245 250 255
 Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met
 260 265 270
 Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys
 275 280 285
 Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly
 290 295 300
 Lys Ser Thr Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr
 305 310 315 320
 Thr Lys Gly Leu Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala
 325 330 335
 Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr
 340 345 350
 Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr
 355 360 365
 Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 370 375 380
 Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly
 385 390 395 400
 Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala
 405 410 415
 Ser Leu His Gly Ala Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser
 420 425 430
 Ala Ala Ala Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly
 435 440 445
 Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly
 465 470 475 480
 Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly
 485 490 495
 Gln Glu Ser Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met
 500 505 510
 Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met
 515 520 525
 Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu
 530 535 540
 Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro
 545 550 555 560
 Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr
 565 570 575
 Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala
 580 585 590
 Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile
 595 600 605
 Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys
 610 615 620
 Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly
 625 630 635 640
 Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro
 645 650 655
 Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr
 660 665 670
 Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly
 675 680 685
 Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala

690 695 700
 Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val
 705 710 715 720
 Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp
 725 730 735
 Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe
 740 745 750
 Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr
 755 760 765
 Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg
 770 775 780
 Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly
 785 790 795 800
 Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu
 805 810 815
 Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe
 820 825 830
 Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala
 835 840 845
 Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu
 850 855 860
 Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln
 865 870 875 880
 Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe
 885 890 895
 Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu
 900 905 910
 Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
 915 920

【図面の簡単な説明】

【図1】

LNCaP-cxD11、LNCaP-cxD2およびLNCaP-FGC細胞の増殖に対するピカルタミドの効果を示す図である。培地 (RPMI1640 + 10% DCC-FBS) 中に懸濁した LNCaP-cxD11、LNCaP-cxD2およびLNCaP-FGC細胞を24穴プレートに40000 cells /プレートで播き、翌日、ピカルタミド添加した。ピカルタミド添加3日後、細胞を計数した。平均 ± 標準誤差、n=3。

【図2】

LNCaP-cxD11、LNCaP-cxD2およびLNCaP-FGC細胞のPSA産生に対するピカルタミドの効果を示す図である。培地 (RPMI1640 + 10% DCC-FBS) 中に懸濁した LNCaP-cxD11、LNCaP-cxD2およびLNCaP-FGC細胞を24穴プレートに40000 cells /プレートで播き、翌日、ピカルタミドを添加した。ピカルタミド添加3日後の上清PSA濃度を測定した。平均 ± 標準誤差、n=3。

【図3】

ピカルタミドによる野生型あるいは変異型(W741C, W741L)ARの転写促進活性を示す図である。各種ARを挿入したベクターDNAおよびアンドロゲン応答性プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたベクターDNAをコトランスフェクションし、0.01あるいは1 μ Mのピカルタミドを添加後のルシフェラーゼ活性を測定した。平均 ± 標準誤差、n=4。

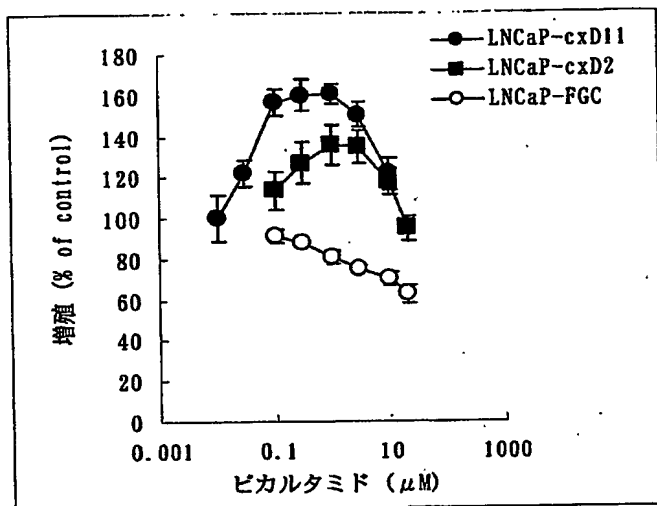
【図4】

W741C型変異ARに対する化合物Aのアンタゴニスト作用を示す図である。W741C型変異ARを挿入したベクターDNAおよびアンドロゲン応答性プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたベクターDNAをコトランスフェクションし、40 nMのDHTあるいは、40 nMのDHTと10 μ Mの化合物Aを添加後のルシフェラーゼ活性を測定した。平均 ± 標準誤差、DHT単独添加群のn=16、DHT+化合物A添加群のn=4。

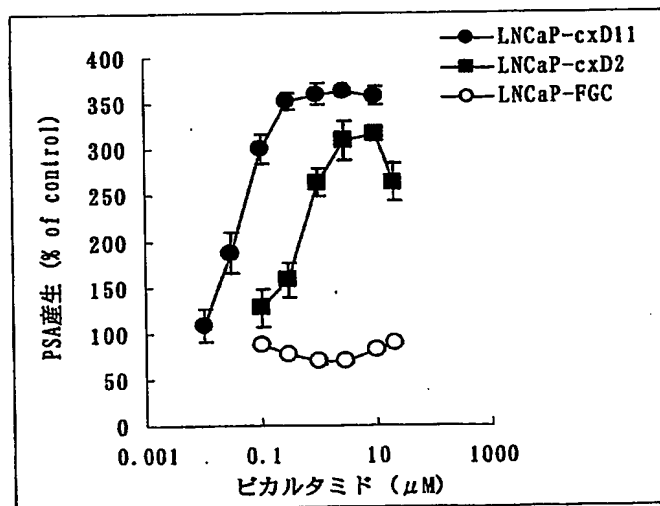
【書類名】

図面

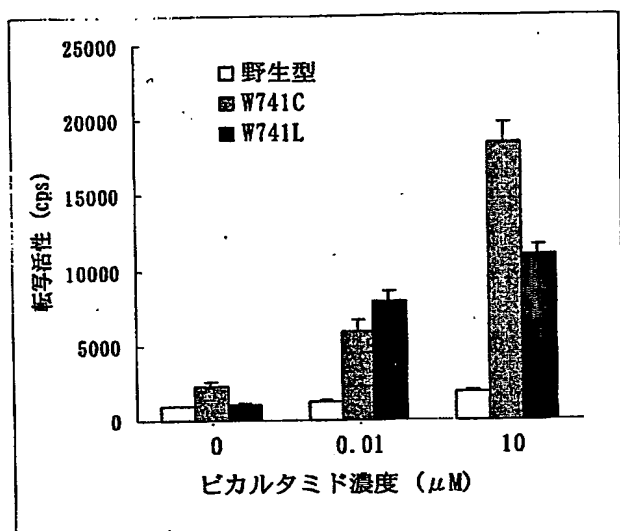
【図 1】



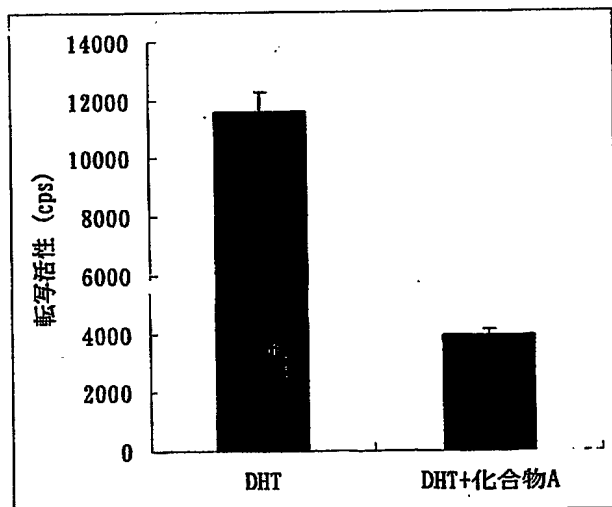
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アンドロゲン非依存性癌の予防・治療薬のスクリーニング等に有用な変異アンドロゲン受容体（AR）の提供。

【解決手段】 変異AR、該ARをコードするDNAなど。変異AR発現癌細胞株をインビトロで作出する方法、該方法により得られる変異AR発現癌細胞株を用いた抗アンドロゲン剤のスクリーニング方法、抗アンドロゲン剤の分類方法、該方法により分類された抗アンドロゲン剤を組み合わせたカクテル療法剤など。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日
 [変更理由] 住所変更
 住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
 氏 名 武田薬品工業株式会社

2. 変更年月日 2003年 5月 9日
 [変更理由] 名称変更
 住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
 氏 名 武田薬品工業株式会社